

UDK 616.697:575.1
577.15:575.1

Utjecaj polimorfizama gena za citosolnu i o kalciju neovisnu fosfolipazu A2 na reproduktivnu sposobnost muškaraca

The role of polymorphisms in genes for the cytosolic and calcium-independent phospholipase A2 in the reproductive fitness of men

Alena Buretić-Tomljanović^{1*}, Ivan Vlastelić², Sergej Nadalin¹, Anđelka Radojčić Badovinac^{1,2}

SAŽETAK. Cilj: Uloga enzima iz superobitelji fosfolipaza A2 indicirana je u testisima, povezano s poremećajem spermatogeneze, te u prednjem režnju hipofize, gdje sudjeluje u lučenju gonadotropnih hormona, prolaktina i ACTH. U radu se istražuje moguća povezanost dvaju polimorfizama, u genu za citosolnu PLA2 (PLA2G4A, rs10798059) i genu za o kalciju neovisnu PLA2 (PLA2G6A, rs4375), s kliničkim značajkama 96 muškaraca s oligoastenosprijom ili astenosprijom, od kojih je 65 imalo neplodnost nepoznata uzroka. **Metode:** U genskoj analizi korištena je metoda PCR-RFLP, a u analizi rezultata χ^2 -test, stupnjevita regresijska analiza i ANOVA. **Rezultati:** Učestalosti ispitanih genotipova i alela nisu značajno različite među ispitanicima i 59 kontrolnih muškaraca. Stupnjevita regresijska analiza pokazala je statistički značajnu povezanost oba polimorfizma s vrijednostima FSH u serumu ispitanika, te polimorfizma iPLA2 s brojem spermija i vrijednostima ukupnog testosterona na razini statističke značajnosti manje od 5%. Dodatna regresijska analiza u skupini 65 muškaraca s idiopatskom neplodnošću potvrdila je povezanost serumske vrijednosti FSH s polimorfizmima iPLA2 ($\beta_{FSH} = 0,504$; $F = 19,827$; $P < 0,0001$) i cPLA2 ($\beta_{FSH} = 0,322$; $F = 9,670$; $P < 0,01$), te serumske vrijednosti LH i polimorfizma iPLA2 ($\beta_{LH} = 0,319$; $F = 6,892$; $P < 0,02$) i to s većom statističkom vjerojatnošću. Genotip C/C iPLA2 polimorfizma udružen je s najvišom srednjom vrijednosti FSH u serumu (višom od fizioloških granica), dok su najniže srednje vrijednosti zabilježene u heterozigota (T/C). LH vrijednosti pokazuju isti uzorak raspodjele prema iPLA2 genotipu, ali je varijabilnost razine hormona unutar fizioloških granica. **Zaključak:** Rezultati upućuju na to da bi navedeni polimorfizmi mogli, zasad nepoznatim mehanizmom, utjecati na proces lučenja gonadotropnih hormona iz prednjeg režnja hipofize i/ili na funkciju testisa, a time i na reproduktivnu sposobnost muškaraca.

Ključne riječi: fosfolipaza A2, genetička analiza, genski polimorfizmi, gonadotropni hormoni, neplodnost, testosteron

ABSTRACT. Aim: The role of PLA2 superfamily enzymes is indicated in the human testes, associated with disturbance of spermatogenesis, and with hormonal secretion from anterior pituitary. The aim of this study was to investigate the association between two polymorphisms (rs10798059 in the cytosolic PLA2 gene -PLA2G4A and rs4375 in the calcium-independent PLA2 gene-PLA2G6A) and clinical features of 96 oligoasthenospermic or asthenospermic men. **Methods:** Sixty five infertile men with idiopathic infertility were included in the study. Genetic analyses were performed using PCR-RFLP method while chi-square test, multiple stepwise regression and ANOVA were used in the statistical analyses. **Results:** The frequencies of cPLA2 and iPLA2 genotypes and alleles were not significantly different between tested group and 59 control men. Multiple stepwise regression analysis showed a statistically significant association between both investigated polymorphisms and FSH serum level in 96 patients ($P < 0,05$). Furthermore, iPLA2 polymorphism was significantly associated with sperm number and total serum testosterone level (in both cases $P < 0,05$). Additional multiple stepwise regression analysis in 65 men with idiopathic infertility confirmed an association between iPLA2 ($\beta_{FSH} = 0,504$; $P < 0,0001$) and cPLA2 ($\beta_{FSH} = 0,322$; $P < 0,01$) polymorphisms and FSH means at a higher level of statistical significance. The same analysis also revealed an association between LH means and iPLA2 polymorphism ($\beta_{LH} = 0,319$; $P < 0,02$). The genotype C/C of the iPLA2 polymorphism was associated with the highest mean FSH value (above the physiologic range) while the lowest mean was found in heterozygotes (T/C). According to iPLA2 genotype, LH means varied within the physiologic range but were distributed in the same manner as did FSH means. **Conclusions:** The results suggest that investigated iPLA2 and cPLA2 polymorphisms might influence the exocytosis of gonadotropins from the anterior pituitary and/or testes function, thus modulating reproductive fitness in men.

Key words: genetic analysis, genetic polymorphisms, gonadotropins, male infertility, phospholipase A2, testosterone

¹Zavod za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

²Odjel za humanu reprodukciju Klinike za ginekologiju i opstetriciju, Klinički bolnički centar Rijeka

Prispjelo: 20. 2. 2008.

Prihvaćeno: 25. 4. 2008.

Adresa za dopisivanje:

***Doc. dr. Alena Buretić-Tomljanović, dipl. ing.**

Zavod za biologiju i medicinsku genetiku
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
Braće Branchetta 22, 51 000 Rijeka
e-mail address: alena@medri.hr
tel. +385 51 651 182
faks +385 51 678 896

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

UVOD

Za stotinjak je gena, raspršenih po čitavom genomu, utvrđeno da bi mogli biti uključeni u proces spermatogeneze. Do tih se spoznaja došlo istraživanjem mnogih mutanata miševa dobivenih genetičkim inženjeringom, u kojih su utvrđene različite anomalije spermatogeneze¹⁻³. Radi se o nizu gena uključenih u procese regulacije staničnog ciklusa, DNA popravka, regulacije transkripcije, staničnog signaliziranja, apoptoze, genima

Za stotinjak je gena utvrđeno da bi mogli biti uključeni u regulaciju procesa spermatogeneze u čovjeka. Aktivnost enzima iz superobitelji fosfolipaza A2 povezuje se s poremećajem spermatogeneze u testisima, a u prednjem režnju hipofize s lučenjem gonadotropnih hormona, prolaktina i ACTH. Poznato je da u odsutnosti fosfolipaza A2 spermiji nisu sposobni oploditi jajnu stanicu *in vitro* niti *in vivo*.

za čimbenike rasta, hormonske receptore, tumorsupresorskim genima, genima koji određuju elemente citoskeleta, brojne enzime i drugim genima. AZF (*engl.* azoospermia factor) područje kromosoma Y (Yq11) također sadrži gene kojima zasad ne razumijemo u potpunosti funkcije. Primjerice, distalni dio AZF područja (AZFc) sadrži čak 11 genskih obitelji s barem 27 funkcionalno različitih gena⁴. Za brojne je mutante miševa utvrđen stupanj spermatogeneze u kojem se pojavljuje poremećaj (na razini spermatogonija, spermatocita, spermatida, tijekom spermiogeneze ili tijekom aktivacije jajne stanice prilikom oplodnje), te jesu li pojedine mutacije povezane s abnormalnošću morfologije glave ili repa spermija, odsutnošću germinativnih stanica, Leydigovih stanica ili pak atrofijom testisa¹.

Smanjena plodnost nađe se i u različitim bolestima, primjerice cističnoj fibrozi, nasljednoj hemokromatozi, nedostatku receptora androgena, kongenitalnoj odsutnosti vas deferensa (*engl.* Congenital Absence of Vas Deferens – CAVD), a može biti udružena i sa sistemskim bolestima poput dijabetesa melitusa ili multiple skleroze.

Enzimi iz superobitelji fosfolipaza A2 (PLA2) također bi mogli biti značajni u etiologiji smanje-

ne plodnosti muškaraca. Studija Baoa i sur.⁵ pokazala je da mužjaci “knock-out” miševa kojima je homolognom rekombinacijom uklonjen gen za o kalciju neovisnu fosfolipazu A2 (*engl.* calcium independent phospholipase A2 – iPLA2) stvaraju spermije vrlo ograničene pokretljivosti. Ti spermiji nisu bili sposobni oploditi jajnu stanicu *in vitro* niti *in vivo*, odnosno, “knock-out” miševi su bili značajno slabije fertilni u odnosu na one divljeg tipa. Nadalje, oštećenjem egzona u genu za citosolnu fosfolipazu A2 (*engl.* cytosolic phospholipase A2 – cPLA2) u mišjim embrionalnim matičnim stanicama, Bonventre i sur.⁶ su također utvrdili smanjenje fertilnosti u mužjaka homozigota za mutirani alel. U homozigotnih ženki zabilježeno je manje trudnoća i u većini slučajeva intrauterina smrt ploda.

Analizom razine aktivnosti iPLA2 enzima u različitim tkivima, utvrđeno je da testisi

imaju najvišu razinu enzima iPLA2, iz čega slijedi da taj enzim obavlja važnu funkciju u muškoj gonadi. Taj su zaključak dodatno poduprli nalazi istih autora da plodnost iPLA2 “knock-out” ženki nije ozbiljnije narušena⁵.

Na ulogu enzima PLA2 u muškoj plodnosti upućuju i studije Ronkko i Rosanena⁷, te Wanga i sur.⁸. Ti su autori utvrdili značajnu povezanost povišene aktivnosti PLA2 enzima u sjemennoj tekućini muškaraca i smanjenog broja spermija (azoospermije ili oligozoospermije u odnosu prema fertilnim muškarcima), kao i statistički neznčajnu korelaciju povišene PLA2 aktivnosti u sjemennoj tekućini i smanjene progresivne pokretljivosti spermija. S druge strane, u muškaraca smanjene plodnosti aktivnost je PLA2 enzima značajno smanjena u akrosomskom području glave spermija⁸.

Superobitelj fosfolipaza A2 sadrži 14 različitih skupina enzima. Funkcije svih fosfolipaza A2 nisu još uvijek dovoljno istražene. Radi se o obitelji enzima koji kataliziraju otpuštanje masnih kiselina na sn-2 položaju glicerola membranskih fosfolipida, stvarajući tako slobodnu masnu kiselinu (*engl.* free fatty acid – FFA) i lizofosfolipid. Fosfolipaze A2 mogu se nalaziti slobodne u citoplazmi, u

nekim organelima, primjerice peroksisomima, ili vezane za membrane endoplazmatske mrežice. Otpuštanje masnih kiselina iz membranskih fosfolipida dio je procesa staničnog signaliziranja. Otpuštene masne kiseline prekursori su moćnih drugih glasnika, ili odlaze u jezgru gdje aktiviraju specifične transkripcijske čimbenike, te time sudjeluju u kontroli genske ekspresije lipofilnih gena (gena uključenih u metabolizam lipida). Na taj način fosfolipaze A2 svojom aktivnošću moduliraju niz staničnih funkcija: reguliraju procese

izvanstaničnog prostora u citoplazmu. Enzimi ove genske superobitelji obavljaju ključne zadaće u različitim tkivima: jetri, gušterači, mozgu, testisima i drugim tkivima. Stoga su geni za barem neke enzime superobitelji fosfolipaza A2 najvjerojatnije kućepaziteljski geni^{11,12}.

Fosfolipaze A2 su klasificirane kao: cistosolne (cPLA2), sekrecijske (sPLA2), o kalciju neovisne (iPLA2) i PAF acetilhidrolaze (PAF – *engl.* platelet derived factor ili čimbenik aktivacije trombocita). Citosolna PLA2 koju kodira gen PLA2G4A (1q25)

Tablica 1. Kliničke značajke 96 muškaraca smanjene plodnosti

Table 1. Clinical features of 96 males with infertility

	Oligoastenospermija				Astenospermija		Ukupno	
	<5x10 ⁶ /ml		≥5x10 ⁶ /ml		≥20x10 ⁶ /ml			
	N=25		N=47		N=24		N=96	
Dob (godine)	33,68 ± 5,83		34,71 ± 4,96		35,62 ± 6,70		34,67 ± 5,65	
Progresivna pokretljivost spermija ^a	16,30 ± 13,70		18,17 ± 13,76		29,11 ± 14,55		20,32 ± 14,65	
FSH (IU/l) ^b	13,41 ± 9,86		7,83 ± 5,56		5,66 ± 2,75		8,75 ± 7,08	
LH (IU/l)	5,40 ± 3,45		4,01 ± 3,31		4,04 ± 2,16		4,37 ± 3,13	
Ukupni testosteron (nmol/l)	16,68 ± 7,35		15,92 ± 5,38		18,59 ± 5,82		16,80 ± 6,09	
Prolaktin (mIU/l)	209,20 ± 76,54		226,59 ± 128,35		212,43 ± 118,70		218,44 ± 113,55	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Hipogonadizam	1	4,0	0	0,0	0	0,0	1	1,0
Varikokela	2	8,0	9	19,1	4	16,7	15	15,6
Kriptorhizam	6	24,0	4	8,5	3	12,5	13	13,5
Prostatitis	1	4,0	2	4,3	0	0,0	3	3,1
Preponska kila	0	0,0	1	2,1	0	0,0	1	1,0

izražene su srednje vrijednosti +/- standardna devijacija

^a p=0,011 (one-way ANOVA)

^b p<0,001 (one-way ANOVA)

stanične signalizacije, održavaju lipidnu homeostazu membrane regulirajući sastav i omjer različitih masnih kiselina u membranskim fosfolipidima (čime osiguravaju integritet membrane), održavaju potrebnu razinu slobodnih lizofosfolipida za ugradnju novih molekula masnih kiselina u membranu, reguliraju upalne procese u organizmu, sudjeluju u indukciji apoptoze i drugim procesima^{9,10}. U biološkim je membranama važna prisutnost dugolančanih polinezasićenih masnih kiselina (*engl.* polyunsaturated fatty acids – PU-FAs) koje pravilnim omjerom n-3/n-6 (ω-3/ω-6) održavaju razinu fluidnosti membrane pogodnu za normalno odvijanje membranskih funkcija: izmjene tvari, endocitoze i egzocitoze, funkciju receptorskih molekula i prijenos signala iz

preferira otpuštanje arahidonske kiseline (AA, 20:4n-6) s položaja sn-2 glicerola, dok o kalciju neovisna PLA2, produkt gena PLA2G6A (22q13.1) češće kao supstrat koristi dokozaheksaensku kiselinu (DHA, 22:6n-3)¹³. Te su masne kiseline supstrati za beta oksidaciju u mitohondrijima, ali i za enzime koji ih metaboliziraju u eikozanoide (derivate koji sadrže 20 atoma ugljika – grč. *eicosa* – 20): prostaglandine, tromboksane, leukotriene i druge. Smatra se da pojačana aktivnost fosfolipaza A2 stvara i više supstrata za slobodne radikale (PUFA sadrže nekoliko dvostrukih kovalentnih veza) koji nastaju u procesima staničnog metabolizma.

Stanične membrane deficitarne s AA ciljevi su fagocitnih stanica, pa smanjenje količine AA ili

promjena omjera specifičnih masnih kiselina u membrani može predstavljati signal za početak apoptoze¹⁴ (fagocitne stanice uklonit će dijelove stanica preostale nakon apoptotičkog procesa). Nadalje, nedostatak AA u membrani narušit će ravnotežu mnogih metaboličkih puteva koji započnu tom dugolančanom masnom kiselinom. Polimorfizmi rs4375 i rs10798059 dvaju PLA2 gena, originalno su opisani i istraživani u bolesnika s duševnim bolestima (shizofrenijom i bipolarnim poremećajem)^{15,16}. Budući da niz dokaza upućuje na ulogu cPLA2 i iPLA2 enzima i u plodnosti i neurotoksičnosti (miševi deficitarni za enzim cPLA2 ne reagiraju upalnom reakcijom mozga nakon ishemije)^{6,17}, odlučili smo istražiti navedene polimorfizme u skupini muškaraca smanjene plodnosti. Cilj istraživanja bio je usporediti učestalosti genotipova i alela polimorfizma jednog nukleotida u genima PLA2G4A (rs10798059) i PLA2G6A (rs4375) u skupini neplodnih muškaraca i kontroli. Cilj je također bio istražiti moguću povezanost navedenih varijacija dvaju gena za fosfolipaze A2 s kliničkim značajkama ispitanika (brojem i progresivnom pokretljivošću spermija, te vrijednostima hormona u serumu). Istraživanjem smo testirali hipotezu prema kojoj polimorfizmi modulacijom enzimske aktivnosti utječu na sastav i omjer dugolančanih masnih kiselina membranskih fosfolipida, te posljedično utječu na pokretljivost spermija. Budući da su enzimi PLA2 ključni i u reakcijama vezanim za stanično signaliziranje, postoji i mogućnost učinka varijacija superobitelji PLA2 gena na složene procese spermatogeneze. Brojne studije povezale su funkciju enzima PLA2 s lučenjem različitih hormona prednjeg režnja hipofize¹⁸⁻²⁵, pa je u tom smislu istražena moguća povezanost polimorfizama dvaju gena iz grupe citosolnih i fosfolipaza A2 neovisnih o prisutnosti iona kalcija, s razinom gonadotropnih hormona, prolaktina i ukupnog testosterona u serumu ispitanika.

METODE

U istraživanju je sudjelovalo 96 muškaraca, bolesnika na Odjelu za humanu reprodukciju Klinike za ginekologiju i opstetriciju Kliničkog bolničkog centra u Rijeci, koji su bili uključeni u neki od programa potpomognute oplodnje zbog poremećaja spermatogeneze ili smanjene pokretljivosti sper-

mija. U svih je ispitanika u studiji prethodno potvrđen uredan kariotip (46,XY), a genetičkim testiranjem na mikrolelecije kromosoma Y isključen je i njihov mogući doprinos neplodnosti. Kariotipizacija je provedena na GTG-pruganim preparatima metafaznih kromosoma. U svakog je ispitanika pregledano 30 mitotičkih stanica. Testiranje na prisutnost mikrolelecije kromosoma Y napravljeno je u skladu s uputama Europskog androloškog udruženja (*engl.* European Academy of Andrology – EAA) i Europske mreže za kvalitetu molekularno-genetičkih analiza²⁶ (*engl.* European Molecular Genetics Quality Network – EMQN). Kliničke značajke 96 ispitanika prikazane su tablicom 1. Prema broju spermija utvrđenom obradom spermograma ispitanici su razvrstani u tri skupine: s teškim oblikom oligoastenospermije ($<5 \times 10^6/\text{ml}$; N=25), oligoastenospermijom ($5 \times 10^6 \leq n < 20 \times 10^6/\text{ml}$; N=47) i astenospermijom ($\geq 20 \times 10^6/\text{ml}$; N=24). U skupinu s astenospermijom uvrštena su 24 ispitanika s vrijednostima progresivne pokretljivosti spermija nižim od 50%. U 31 od 96 testiranih ispitanika (32,3%) potvrđene su kliničke dijagnoze hipogonadizma (hipergonadotropni hipohonadizam u jednog ispitanika), varikokele, jednostranog kriptorhizma, prostatitisa, preponske kile ili njihova kombinacija. U preostalih 65 od 96 (67,7%) ispitanika radilo se o neplodnosti nepoznata uzroka (idiopatska neplodnost). Kontrolnu skupinu činilo je 59 muškaraca, dobrovoljnih davatelja krvi. Iako ne raspoložemo podatcima o njihovom reproduktivnom statusu, smatramo da predstavljaju slučajno izabrani uzorak opće populacije, s obzirom na to da se radi o osobama koje ne boluju od kroničnih bolesti niti uzimaju medikamentoznu terapiju. Svi su ispitanici testirane i kontrolne skupine upoznati sa svrhom studije, te su potpisali pristanak da su informirani o istraživanju. Istraživanje su odobrila Etička povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci i Kliničkog bolničkog centra Rijeka.

Analiza sjemena obavljena je u skladu s uputama Svjetske zdravstvene organizacije²⁷ (*engl.* World Health Organization – WHO) aparatom UltiMate Sperm Analyzer (Hamilton Thorne Biosciences). Broj spermija smatran je normalnim ukoliko je iznosio $\geq 20 \times 10^6/\text{ml}$, dok je vrijednost normalne progresivne pokretljivosti spermija iznosila $\geq 50\%$. Serumske razine FSH, LH i prolaktina utvrđene su

metodom kemoluminiscencije (Immulite® FSH, DPC; Immulite®/ Immulite® 1000 LH, DPC; Immulite®/ Immulite® 1000 Prolactin, Siemens), dok je razina ukupnog serumskog testosterona procijenjena radioimunoesejom na krutom nosaču (*engl.* solid-phase radioimmunoassay, Coat-A-Count® Total Testosterone In-vitro Diagnostic Test Kit, DPC). Normalnim vrijednostima hormona u serumu ispitanika smatrane su one unutar raspona 1.1 – 13.5 IU/l (FSH), 0.4 – 5.7 IU/l (LH); 10.0 – 49.0 nmol/l (testosteron) i 65.0 – 350.0 mIU/l (prolaktin).

ANALIZA GENETIČKIH POLIMORFIZAMA

Genomska DNA je izolirana iz pune krvi uporabom izolacijskog kita (QIAmp Blood Kit – Qiagen, Hilden, Njemačka) prema uputama proizvođača. Genotipizacija je napravljena lančanom reakcijom polimeraze, te analizom restrikcijskih fragmenata (*engl.* polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism PCR-RFLP). U ovom istraživanju nisu analizirani mogući učinci raznovrsnih gonadotoksina poput kemikalija, duhana ili alkohola.

U radu su analizirana dva polimorfizma jednog nukleotida (*engl.* single nucleotide polymorphisms – SNPs): rs4375 u genu PLA2G6 i rs10798059 u genu PLA2G4A. Nakon PCR reakcije slijedila je restrikcija PCR produkta s Bln I (u slučaju rs4375) i Ban I (u slučaju rs10798059) restrikcijskim endonukleazama. Polimorfizam rs4375 se nalazi u intronu 4 gena PLA2G6A. Radi se o C/T polimorfizmu, dok se SNP BanI nalazi u promotorskom dijelu gena PLA2G4A, a radi se o A/G polimorfizmu. Nukleotidni slijed korištenih DNA početnica bio je sljedeći: PLA2G6f-GGGGTTTATTTGCTGGGTT, PLA2G6Ar-CAAGGGTGATGGGGAGATC, PLA2G4Af-AGGGATTTGTAGAGGACT, PLA2G4Ar-TAGATGATTCGATTTTATGACT. Uvjeti PCR reakcije i RFLP analize preuzeti su, uz manje modifikacije, iz rada Meire Lime i sur.¹⁶

STATISTIČKA ANALIZA

Statistička analiza napravljena je programom Statistica for Windows 7.1 (Stat soft, Inc. 2001) za koji Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci posjeduje licencu.

Učestalosti alela izračunate su brojenjem genskih varijanata u ukupno 192 analizirana kromosoma

u testiranoj skupini i 118 analiziranih kromosoma u kontroli. Moguća odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže, kao i statistička značajnost razlike učestalosti alela i genotipova na oba lokusa procijenjeni su χ^2 -testom.

Razlike srednjih vrijednosti i njihovih standardnih devijacija kliničkih značajki (dob, progresivna pokretljivost spermija, razina hormona) ispitanika razvrstanih prema broju spermija (tablica 1) testirane su analizom varijance (one-way ANOVA). Moguć sinergistički učinak obaju polimorfnih lokusa ispitan je višefaktorskom analizom varijance (*engl.* factorial ANOVA). Tablicama multiplih odgovora i χ^2 -testom utvrđena je učestalost hipogonadizma, varikokele, kriptorhizma, prostatitisa i hernije u testiranih ispitanika, te učestalosti pojedinih genotipova u podskupinama bolesnika (prema broju spermija). Stupnjevitom regresijskom analizom ispitali smo povezanost genotipova obaju lokusa, prisutnosti pojedinih alela (neovisne varijable), i kliničkih dijagnoza hipogonadizma, varikokele, kriptorhizma, prostatitisa i hernije s brojem i progresivnom pokretljivošću spermija, te razinama hormona u serumu (ovisne varijable). Genotipovi su, u slučaju polimorfizma rs4375 i rs10798059, evaluirani kao C/C i T/T homozigoti ili T/C heterozigoti, odnosno A1A1 (A/A) i A2A2 (G/G) homozigoti ili A1A2 heterozigoti (A/G). Aleli su razmatrani na sljedeći način: ispitaniku je pridružen broj 1 ukoliko je njegov genotip sadržavao određeni alel, odnosno, broj 0 ukoliko je ispitanik bio homozigot za drugi oblik gena. Stupnjevita regresijska analiza omogućila je otkrivanje onih neovisnih varijabli koje su statistički značajno korelirale s određenom ovisnom varijablom. Stupnjevita regresijska analiza započinje bez ijedne neovisne varijable u regresijskoj jednadžbi, te zatim u koracima dodaje varijable ovisno o stupnju povezanosti s ovisnom varijablom, a prema zadanim kriterijima. Kao ulazni kriterij korištena je vrijednost faktora $F=3,0$, dok je kao izlazni kriterij korištena vrijednost $F=1,0$. U prvom koraku u jednadžbu ulazi neovisna varijabla s najvišim koeficijentom korelacije s ovisnom varijablom, a u drugom i sljedećim koracima u regresijsku jednadžbu ulaze varijable s najvišim parcijalnim koeficijentima korelacije s istom ovisnom varijablom. Na taj način moguće je dobiti nekoliko modela koji statistički značajno opisuju ovisnu va-

rijablu: model s jednom neovisnom varijablom i modele s dvije ili više neovisnih varijabli. Statistički značajne razlike u svim su analizama potvrđene na razini $P < 0,05$.

REZULTATI

U tablici 2 prikazane su učestalosti genotipova i alela polimorfizama rs4375 i rs10798059. U slučaju polimorfizma Ban I nema razlike u učestalostima A1 i A2 alela, niti kombinacija genotipova između neplodnih muškaraca i kontrole.

T alel polimorfizma rs4375 ima nešto manju, a C alel nešto veću učestalost u neplodnih muškaraca negoli u kontroli, međutim razlika nije statistički značajna. Razlike u učestalosti genotipova polimorfizma rs4375 također nisu dostigle razinu statističke značajnosti.

S obzirom na broj ispitanika u istraživanju, snaga ove studije da otkrije 2,2 puta veću ili manju učestalost C/C homozigota (rs4375) u testiranih ispitanika u odnosu prema kontroli iznosila je 80% (učestalost C/C homozigota u kontroli je

Tablica 2. Učestalosti genotipova i alela gena za citosolnu (PLA2G4A) i o kalciju neovisnu (PLA2G6A) fosfolipazu A2 u neplodnih muškaraca i kontrolnih ispitanika^a

Table 2. The frequencies of genotypes and alleles of cytosolic PLA2 (PLA2G4A) and calcium independent PLA2 (PLA2G6A) genes in infertile and control^a

PLA2G4A-rs10798059	genotipovi			aleli	
	A1A1	A1A2	A2A2	A1	A2
ispitanici (N=96)	11 (11,5%)	49 (51,0%)	36 (37,5%)	71 (37,0%)	121 (63,0%)
kontrole (N=59)	10 (16,9%)	26 (44,1%)	23 (39,0%)	46 (39,0%)	72 (61,0%)
PLA2G6A-rs4375 rs rs4375	genotipovi			aleli	
	TT	TC	CC	T	C
ispitanici (N=96)	33 (34,4%)	49 (51,0%)	14 (14,6%)	115 (59,9%)	77 (40,1%)
kontrole (N=59)	25 (42,4%)	26 (44,1%)	8 (13,6%)	76 (64,4%)	42 (35,6%)

^arazlike u učestalostima genotipova i alela nisu statistički značajne ($P > 0,05$)

Tablica 3. Sažetak stupnjevite regresijske analize za broj i pokretljivost spermija, te razinu hormona u odnosu prema PLA2 genotipovima i alelima^a i kliničkim značajkama^b neplodnih muškaraca (N=96)

Table 3. Summary of multiple stepwise regression analysis for sperm number, progressive sperm motility, and hormonal levels as predicted by PLA2 genotypes and alleles, and clinical features in infertile men (N=96)

Ovisna varijabla	Neovisna varijabla (model) ^c	β	Multipli R ²	Promjena multiplog R ²	F ^d	p
broj spermija	iPLA2 (1)	- 0,23	0,052	0,052	5,132	0,026
progresivna pokretljivost spermija	varikokela (1)	-0,330	0,089	0,089	6,954	0,010
	prostatitis (2)	0,251	0,151	0,062	5,106	0,027
FSH	iPLA2 (1)	0,275	0,054	0,054	5,274	0,024
	hipogonadizam (2)	0,228	0,109	0,055	5,601	0,020
	cPLA2 (3)	-0,210	0,154	0,045	4,817	0,031
LH	varikokela (1)	0,186	0,034	0,034	3,245	0,075 ^e
ukupni testosteron	iPLA2 C alel (1)	0,206	0,042	0,042	4,071	0,047
prolaktin	varikokela (1)	0,181	0,033	0,033	3,120	0,081 ^e

^a genotipovi uključuju homozigote i heterozigote za alele A1 i A2 (PLA2G4A), alele T i C (PLA2G6A)

^b prisutnost varikokele, hipogonadizma, kriptorhizma, hernije ili prostatitisa

^c modeli neovisnih varijabli: (1) – uključuje jednu neovisnu varijablu; (2) – uključuje dvije neovisne varijable; (3) – uključuje tri neovisne varijable

^d kriteriji za ulazak i izlazak neovisne varijable iz regresijske jednadžbe: F za ulazak=3, F za izlazak=1.

^e nije statistički značajno ($p > 0,05$)

14,6%). U slučaju polimorfizma rs10798059 snaga studije bila je 80% da otkrije 2,0 puta veću ili manju učestalost genotipa A1A1 u muškaraca smanjene plodnosti (učestalost genotipa A1A1 u kontroli iznosila je 16,9%).

Kliničke podskupine naših ispitanika razvrstanih prema broju spermija ne razlikuju se prema srednjoj dobi ispitanika, ali se značajno razlikuju s obzirom na srednje vrijednosti progresivne pokretljivosti spermija ($P=0,011$) i razine serumskog FSH ($P=0,001$) (tablica 1). Varikokela (15,6%) i kriptorhizam (13,5%) su vodeći čimbenici neplod-

gonadizam u značajnoj mjeri određuju razinu serumskog FSH (tablica 3). Razina statističke značajnosti u sva je tri slučaja niža od 5%. Vrijednosti R^2 pokazuju koji dio varijabilnosti ovisne varijable opisuje neovisna varijabla (prediktor). U tablici 3 može se uočiti da svi prediktori zajedno statistički značajno opisuju 15,1%, odnosno, 15,4% varijabilnosti progresivne pokretljivosti spermija i razine serumskog FSH, i 5,2% varijacija broja spermija u našem uzorku neplodnih muškaraca.

Zbog činjenice da je prethodna regresijska analiza pokazala povezanost dvaju ispitivanih polimorfi-

Tablica 4. Sažetak stupnjevite regresijske analize za broj i pokretljivost spermija, te razinu hormona u odnosu prema PLA2 genotipovima i alelima^a muškaraca s idiopatskom neplodnošću (N=65)

Table 4. Summary of multiple stepwise regression analysis for sperm number, progressive sperm motility, and hormonal levels as predicted by PLA2 genotypes and alleles in males with idiopathic infertility (N=65)

Ovisna varijabla	Neovisna varijabla (model) ^b	β	Multipli R^2	Promjena multiplog R^2	F^c	p
broj spermija	iPLA2 (1)	-0,240	0,055	0,055	3,280	0,075 ^d
progresivna pokretljivost spermija	nema prediktora	-	-	-	-	-
FSH	iPLA2 (1)	0,504	0,242	0,242	19,827	0,00004
	cPLA2 A1 alel (2)	0,322	0,346	0,104	9,670	0,00285
LH	iPLA2 (1)	0,319	0,102	0,102	6,892	0,011
ukupni testosteron	iPLA2 C alel (1)	0,220	0,049	0,049	3,162	0,080 ^d
prolaktin	nema prediktora	-	-	-	-	-

^a genotipovi uključuju homozigote i heterozigote za alele A1 i A2 (PLA2G4A), alele T i C (PLA2G6A)

^b modeli neovisnih varijabli: (1) – uključuje jednu neovisnu varijablu; (2) – uključuje dvije neovisne varijable; (3) – uključuje tri neovisne varijable

^c kriteriji za ulazak i izlazak neovisne varijable iz regresijske jednadžbe: F za ulazak=3, F za izlazak=1.

^d nije statistički značajno ($p>0,05$)

nosti u našem uzorku (tablica 1). Klinički hipogonadizam, kao i preponsku kilu pronašli smo u samo jednoga ispitanika (1,0% u oba slučaja). Prostatitis je bio zastupljen u 3,1% neplodnih muškaraca.

Stupnjevita regresijska analiza (tablica 3) rezultirala je s tri modela statistički značajnih neovisnih varijabli koji su sadržavali jedan, dva ili tri neovisna prediktora. Ta je analiza pokazala da je broj spermija statistički značajno povezan s genotipom polimorfizma rs4375 u genu PLA2G6A ($P<0,05$). Na progresivnu pokretljivost spermija značajno utječu prisutnost varikokele i prostatitisa ($P<0,02$, odnosno, $P<0,05$), ali ne i varijacije ispitivanih polimorfizama u genima za fosfolipaze A2. Ipak, PLA2G6A i PLA2G4A genotipovi te hipo-

zama s nekim kliničkim značajkama muškaraca smanjene plodnosti, iz daljnje smo analize izuzeli ispitanike s kliničkom dijagnozom varikokele, kriptorhizma i hipogonadizma kako bismo što preciznije procijenili stupanj povezanosti pojedinih varijabli s genotipovima i alelima polimorfizama rs4375 i rs10798059. Ponovili smo stupnjevitu regresijsku analizu s istim ovisnim varijablama (tablica 4). U toj je analizi broj ispitanika manji (N=65), no razina statistički značajne povezanosti bitno je viša u slučaju serumskog FSH, te PLA2G6A genotipa i PLA2G4A A1 alela ($\beta_{iPLA2}=0,504$, $P=0,00004$; $\beta_{cPLA2-A1}=-0,322$, $P=0,00285$). Iznenađujuće visok dio varijabilnosti serumskog FSH opisuju dva PLA2 polimorfizma ($R^2_{iPLA2}=24,2\%$; $R^2_{cPLA2-A2}=10,4\%$). Polimorfizam rs4375 statistički

značajno opisuje i razinu LH u serumu, iako u nešto manjoj mjeri negoli razinu FSH ($\beta_{iPLA2} = -0,31$, $P=0,011$, $R^2=0,102$). Na manjem broju ispitanika pokazala se granično značajna povezanost broja spermija i razine ukupnog serumskog testosterona s PLA2G6A genotipom ($\beta_{broj\ spermija} = -0,240$, $P=0,075$; $\beta_{testosteron} = -0,220$, $P=0,080$). Budući da, u skladu s očekivanjima, broj spermija statistički značajno korelira s razinom serumskog FSH ($\beta = -0,302$, $p < 0,01$; rezultati nisu prikazani), može se zaključiti da povezanost polimorfizma rs4375 s brojem spermija ustvari prikazuje povezanost

muškarci sa C/C genotipom imaju najviše vrijednosti LH, koje se podudaraju s gornjom fiziološkom granicom ($5,76 \pm 4,62$). Povezanost razine LH i rs4375 genotipa pokazuje i analiza varijance (ANOVA, $P=0,035$, $F=3,511$, $df=2$). Navedeni rezultati ponukali su nas da ispitamo raspodjelu rs4375 i rs10798059 genotipova prema dijagnostičkim podskupinama teške oligoastenospermije, oligoastenospermije i astenospermije. χ^2 -test napravljen na ukupnom uzorku ispitanika ($N=96$) pokazao je granično značajnu akumulaciju C/C genotipa polimorfizma rs4375 u ispitanika s

Tablica 5. Vrijednosti FSH i LH s obzirom na genotip polimorfizama PLA2G6A i PLA2G4A u 65 muškaraca s idiopatskom neplodnošću (ANOVA)

Table 5. FSH and LH mean values according to PLA2G6A and PLA2G4A genotype in 65 men with idiopathic infertility

Genotip PLA2G6A – rs4375	N=65	FSH (IU/l) ^a	LH (IU/l) ^b
T/C	34	5,413 \pm 3,576	3,417 \pm 2,129
T/T	23	9,045 \pm 4,874	4,593 \pm 1,915
C/C	8	14,713 \pm 11,099	5,763 \pm 4,621
Genotip PLA2G4A – rs10798059	N=65	FSH (IU/l) ^c	LH (IU/l)
A1A1, A1A2 (prisutan alel A1)	26	9,409 \pm 6,883	4,417 \pm 2,990
A2A2 (odsutan alel A1)	39	5,592 \pm 3,939	3,691 \pm 1,823

^a $P=0,00012$

^b $P=0,036$

^c $P=0,014$

PLA2G6A genotipa s razinom FSH u serumu ispitanika.

U tablici 5 prikazane su srednje vrijednosti FSH i LH u serumu muškaraca smanjene plodnosti ovisno o genotipu dvaju polimorfizama (rs4375 i rs10798059), te prisutnosti ili odsutnosti alela A1 u genu PLA2G4A. Iz tablice je uočljivo da najvišu vrijednost serumskog FSH imaju ispitanici sa C/C genotipom polimorfizma u genu PLA2G6A. Srednja vrijednost serumskog FSH u tih ispitanika prelazi fiziološke granice ($14,71 \pm 11,10$). Najnižu srednju vrijednost serumskog FSH imaju muškarci genotipa T/C, odnosno, homozigoti imaju više vrijednosti u odnosu prema heterozigotima ($P=0,000119$, $F=10,49$, $df=2$ ANOVA). Prisutnost cPLA2 A1 povezana je također s višim razinama FSH, ali unutar fizioloških granica ($P=0,014$, $F=6,34$, $df=1$, ANOVA). U slučaju LH, kao i u prethodnom slučaju, najniže vrijednosti imaju heterozigoti, dok se srednje vrijednosti penju u slučajevima homozigota T/T, odnosno, C/C (rs4375). Neplodni

teškim oblikom oligoastenospermije, odnosno, heterozigota T/C u ispitanika s astenospermijom, ali normalnim brojem spermija (Pearsonov $\chi^2=9,162$, $P=0,057$, $df=4$).

Višefaktorskom analizom varijance potvrđen je statistički značajan sinergistički učinak dvaju polimorfizama na serumske vrijednosti FSH u našem uzorku neplodnih muškaraca (za kombinaciju genotipova rs4375*rs10798059: $P=0,036$, $F=3,048$, $df=3$; za kombinaciju genotipova rs4375 i prisutnosti ili odsutnosti alela A1 u rs10798059: $P=0,021$; $F=4,147$, $df=2$).

RASPRAVA

Enzimi iz obitelji PLA2 imaju širok spektar djelovanja. Aktivni su u mnogim tkivima i uključeni u brojne stanične procese. Fosfolipazna A2 aktivnost pronađena je i u testisima i u mozgu, pa se uloga tih enzima može razmotriti na obje razine. Spermatogeneza je složen proces čije odvijanje potiču gonadotropni hormoni hipofize, a oni su

pak pod kontrolom hipotalamusa. Neplodni muškarci imaju poremećenu spermatogenezu, ali isto tako i funkcije Sertolijevih i Leydigovih stanica testisa²⁸. Sertolijeve stanice osiguravaju strukturnu potporu i čine optimalno okruženje za odvijanje spermatogeneze, a njihov broj u testisu utječe na broj zrelih spermija koje će stvarati testis odrasle osobe^{29,30}. Na proliferaciju Sertolijevih stanica u fetalno doba i njihovo održavanje u odraslom testisu utječe FSH (folikulo-stimulirajući hormon)³¹. FSH, potičući aktivnost Sertolijevih stanica, utječe i na pokretljivost i oblik zrelih spermija. Nadalje, Sertolijeve stanice pozitivno kontroliraju lučenje testosterona iz Leydigovih intersticijskih stanica. LH (luteinizirajući hormon) također regulira funkciju Sertolijevih stanica, međutim, drugačije negoli FSH. LH potiče Sertolijeve stanice na sekreciju transferrina (Tf) neophodnog za odvijanje spermatogeneze³². Vrijednosti LH u sjemenoj tekućini muškaraca s oligozoospermijom i oligoastenosprijom višestruko su veće od onih serumskih, a njihova je spermatogeneza oštećena, odnosno prijevremeno zaustavljena.

Rezultati našega istraživanja pružaju nove dokaze o genetičkom utjecaju na hipotalamno-hipofizno-gonadnu os u muškaraca smanjene plodnosti. Nedavno smo u 97 muškaraca s idiopatskom neplodnošću pronašli sinergistički učinak mutacije H63D u genu za hemokromatozu i C2 alela gena za transferin (TF)³³. Nositelji obiju varijanata imali su vrijednosti LH u serumu značajno iznad fizioloških granica. U ovoj smo studiji pronašli utjecaj obaju ispitanih polimorfizama gena za PLA2 na serumске vrijednosti FSH i LH u 65 muškaraca s idiopatskom neplodnošću. Posebno je visoka povezanost obaju polimorfizama rs4375 u genu PLA2G6A (iPLA2) i rs10798059 u genu PLA2G4A (tablica 4) s razinom FSH u serumu ispitanika. Razina statističke značajnosti u slučaju FSH manja je od 0,01%, a u slučaju LH manja od 1%. Statistički značajnu povezanost broja spermija i vrijednosti ukupnog testosterona utvrdili smo na ukupnom uzorku od 96 neplodnih muškaraca (ta-

blica 3), međutim u sljedećoj regresijskoj analizi (samo muškarci s idiopatskom neplodnošću), ta je povezanost izgubila na statističkoj značajnosti (tablica 4). Analiza srednjih vrijednosti FSH i LH prema genotipu za svaki pojedini polimorfizam pokazala je da najviše vrijednosti FSH u serumu (iznad fizioloških granica) imaju ispitanici sa C/C genotipom u polimorfizmu rs4375 (tablica 5). Isti ispitanici imaju i najviše vrijednosti LH (oko gornje fiziološke granice). Polimorfizam rs10798059 također modulira vrijednosti obaju hormona, ali unutar fizioloških granica. Neplodni muškarci koji

Rezultati istraživanja pružaju nove dokaze o genetičkom utjecaju na hipotalamno-hipofizno-gonadnu os u muškaraca smanjene plodnosti. U ovoj smo studiji pronašli utjecaj obaju ispitanih polimorfizama gena za fosfolipaze A2 na serumске vrijednosti FSH i LH u muškaraca s idiopatskom neplodnošću. Rezultati upućuju na to da bi navedeni polimorfizmi mogli utjecati, zasad nepoznatim mehanizmom, na proces lučenja gonadotropnih hormona iz prednjeg režnja hipofize i/ili na funkciju testisa, a time i na reproduktivnu sposobnost muškaraca.

imaju A1 alel u svom genotipu imaju više vrijednosti u odnosu na ispitanike s drugačijim genotipom. Razlike FSH i LH vrijednosti su statistički značajne. Dapače, oba polimorfizma zajedno opisuju čak 34,6% varijabilnosti FSH, a polimorfizam rs4375 10,2% varijabilnosti LH u naših ispitanika. Ti rezultati upućuju da bi istraženi polimorfizmi gena PLA2G6A i PLA2G4A mogli modulirati aktivnost iPLA2 i cPLA2 u sekrecijskim stanicama prednjeg režnja hipofize ili modulirati neku drugu specifičnu funkciju enzima. Primjerice, protein iPLA2 na N-terminalnom kraju sadrži 8 ankirinskih ostataka važnih za interakcije enzima s drugim proteinima, što bi moglo biti važno tijekom procesa egzocitoze (lučenja hormona). Nadalje, enzim iPLA2 postoji u multiplim oblicima, a alternativno sazrijevanje (*engl.* alternative splicing) iPLA2 mRNA izravno utječe na aktivnost iPLA2 enzima³⁴. Rezultati brojnih radova podupiru ulogu cPLA2 enzima u sekreciji gonadotropnih hormona hipofize, prolaktina i adenokortikotropnog hormona (ACTH)^{18-22,24,25} i iPLA2 enzima u sekreciji inzulina i amilaze iz stanica parotidne žlijezde^{23,35,36}. U pro-

cesu lučenja hormona ključna je molekula AA, odnosno njezini specifični metaboliti. Glikozilacija i lučenje LH temelje se na reakcijama ovisnim o kalciju. Lučenje LH može se zaustaviti dodatkom blokatora ionskih kanala za kalcij²¹ ili potaknuti aktivatorima Ca²⁺-ovisne PLA2¹⁹, što upućuje na ulogu citosolne, o kalciju ovisne PLA2 u procesu egzocitoze toga hormona. Metabolički put odgovoran za lučenje hormona prednjeg režnja hipofize uključuje aktivnost proteinske kinaze C koja aktivira enzim cPLA2. Aktivirana cPLA2 se premješta sa svog citosolnog položaja do unutarstaničnih membrana, te potiče otpuštanje AA sa sn-2 položaja membranskih fosfolipida. Na primjeru lučenja ACTH i prolaktina pokazano je da su za efektivnu egzocitozu hormona ključni metaboliti AA koji nastaju metaboličkom kaskadom citokrom P-450 epoksigenaze^{22,24,25}. Blokada tog metaboličkog puta zaustavlja sekreciju hormona, dok blokade ciklooksigenaza i lipoksigenaza (kojima je supstrat također AA) nisu imale učinka. Rezultati našeg istraživanja upućuju na to da bi polimorfizmi enzima cPLA2 i iPLA2 mogli modulirati procese egzocitoze gonadotropnih hormona hipofize (FSH i LH), iako zasad ne možemo govoriti o kojim je mehanizmima riječ. Jedina studija koja je pokušala povezati genotip polimorfizma rs10798059 gena PLA2G4A s enzimskom aktivnošću, pronašla je statistički značajno višu aktivnost cPLA2 enzima u serumu shizofrenih bolesnika genotipa A2A2³⁷. Ipak ne možemo isključiti niti mogućnost djelovanja istraženih polimorfizama PLA2 na razini testisa, gdje bi modulacijom procesa spermatogeneze utjecale na aktivnost hipofize. Potrebne su nove studije koje će istražiti povezanost pojedinih genotipova, varijabilne aktivnosti PLA2 enzima, i njihove moguće učinke na organizam. Pritom treba voditi računa i o činjenici da na aktivnost citosolne PLA2 mogu utjecati čimbenici okoline, ponajprije prehrana i pušenje. Prehrana bogata n-3 PUFA može izmijeniti sastav i omjer dugolančanih masnih kiselina u membrana, te tako modulirati aktivnost PLA2, smanjiti peroksidaciju lipida i uravnotežiti procese sveukupnih metaboličkih kaskada koje započinju arahidonskom kiselinom (sinteza raznovrsnih eikozanioda), dok, kao što je poznato, konzumiranje nikotina smanjuje aktivnost citosolne PLA2³⁸⁻⁴¹.

Ovo istraživanje poticano je sredstvima projekata 062-0982522-0369 i 062-0000000-3553 odobrenih od Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske.

LITERATURA

- Escalier D. Impact of genetic engineering on the understanding of spermatogenesis. Human reproduction update 2001; 7:191-210.
- Wang H, Zhou Z, Xu M, Li J, Xiao J, Xu ZY et al. A spermatogenesis-related gene expression profile in human spermatozoa and its potential clinical applications. J Mol Med 2004; 82:317-24.
- Feig C, Kirchhoff C, Ivell R, Naether O, Schulze W, Spiess AN. A new paradigm for profiling testicular gene expression during normal and disturbed human spermatogenesis. Mol Hum Reprod 2007;13:33-43.
- Yen P. The fragility of fertility. Nature Genet 2001;29:243-4.
- Bao S, Miller DJ, Ma Z, Wohltmann M, Eng G, Ramadham S et al. Male mice that do not express group VIA phospholipase A2 produce spermatozoa with impaired motility and have greatly reduced fertility. J Biol Chem 2004;279:38194-200.
- Bonventre JV, Huang Z, Taheri MR, O'Leary E, Li E, Moskowitz MA et al. Reduced fertility and postischemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A2. Nature 1997;390:622-5.
- Ronkko S, Rasanen M. Synovial-type (group II) phospholipase A2 human seminal plasma. Int J Biochem 1992;24:987-92.
- Wang SK, Huang YF, Li BT, Xia XY, Wang ZZ. Detection and clinical significance of phospholipase A2 in semen of male infertile patients, Zhonghua Nan Ke Xue 2003;9:90-3.
- Abel S, Smuts CM, Villiers C de, Gelderblom WCA. Changes in essential fatty acid patterns associated with normal liver regeneration and the progression of hepatocyte nodules in rat hepatocarcinogenesis. Carcinogenesis 2001;22:795-804.
- Balsinde J, Balboa MA. Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in activated cells. Cell Signal 2005;17:1052-62.
- Skosnik PD, Yao JK. From membrane phospholipid defects to altered neurotransmission: is arachidonic acid a nexus in the pathophysiology of schizophrenia? Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2003;69:367-84.
- Law MH, Cotton RGH, Berger GE. The role of phospholipase A2 in schizophrenia. Mol Psychiatry 2006;11:547-56.
- Green JT, Orr SK, Bazinet RP. The emerging role of group VI calcium-independent phospholipase A2 in releasing docosahexaenoic acid from brain phospholipids. J Lipid Res 2008;49:939-44.
- Zhang Z, Lee Y-Ch, Kim SY, Choi MS, Tsai PC, Saha A et al. Production of lysophosphatidylcholine by cPLA2 in the brain of mice lacking PPT1 is a signal for phagocyte infiltration. Hum Mol Genet 2007;16:837-47.
- Pae CU, Yu HS, Lee KU, Kim JJ, Lee CU, Jun TY et al. Ban I polymorphism of the cytosolic phospholipase A2 gene

- may confer susceptibility to the development of schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2004;28:739-41.
16. Meira-Lima I, Jardim D, Junqueira R, Ikenaga E, Vallada H. Allelic association study between phospholipase A2 genes and bipolar affective disorder. *Bipolar Disorder* 2003;5:295-9.
 17. Klivenyi P, Flint Beal M, Ferrante RJ, Andreassen OA, Wermer M, Chin M-R et al. Mice deficient in group IV Cytosolic phospholipase A2 are resistant to MPTP neurotoxicity. *J Neurochem* 1998;71:2634-7.
 18. Kiesel L, Rabe T, Hauser G, Przylipek A, Jadali F, Runnebaum B. Stimulation of luteinizing hormone release by melittin and phospholipase A2 in rat pituitary cells. *Mol Cell Endocrinol* 1987;51:1-6.
 19. Kurihara H, Kitajama K, Senda T, Fujita H, Nakajama T. Multigranular exocytosis induced by phospholipase A2-activators, melittin and mastoparan, in rat anterior pituitary cells. *Cell Tissue Research* 1986;243:311-6.
 20. Thomson FJ, Johnson MS, Mitchell R, Wolbers B. Evidence for a role of phospholipase A2 in the mechanism of LHRH priming in rat anterior pituitary tissue. *J Endocrinol* 1994;141:15-31.
 21. Liu TC, Jackson GL. Synthesis and release of luteinizing hormone in vitro by rat anterior pituitary cells: effects of gallopamil hydrochloride (D600) and pimozide. *Endocrinol* 1985;117:1608-14.
 22. Grandison L. Stimulation of anterior pituitary prolactin release by melittin, an activator of phospholipase A2. *Endocrinol* 1984;114:1-7.
 23. Takuma T, Ichida T. Role of Ca²⁺-independent phospholipase A2 in exocytosis of amylase from parotid acinar cells. *J Biochem* 1997;121:1018-24.
 24. Luini AG, Axelrod J. Inhibitors of the cytochrome P-450 enzymes block the secretagogue-induced release of corticotropin in mouse pituitary tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:1012-4.
 25. Cowell AM, Flower RJ, Buckingham JC. Studies on the roles of phospholipase A2 and eicosanoids in the regulation of corticotropin secretion by rat pituitary cells in vitro. *J Endocrinol* 1991;130:21-32.
 26. Simoni M, Bakker E, Eurlings MCM, Matthijs G, Moro E, Müller CR, Vogt PH. Laboratory guidelines for the molecular diagnosis of Y chromosomal microdeletions. European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) 2001;1-7.
 27. World Health Organisation Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction, 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press 1999.
 28. Andersson AM, Jørgensen N, Frydelund-Larsen L, Raypert-De Meyts E, Skakkebaek NE. Impaired Leydig cell function in infertile men: a study of 357 idiopathic infertile men and 318 proven fertile controls. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3161-7.
 29. Migrenne S, Chrystèle Racine, Guillou F, Habert R. Pituitary hormones inhibit the function and differentiation of fetal Sertoli cells. *Endocrinol* 2003;144:2617-22.
 30. Walker WH, Cheng J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction* 2005;130:15-28.
 31. Grover A, Smith CE, Gregory M, Cyr DG, Sairam MR, Hermo L. Effects of FSH receptor deletion on epididymal tubules and sperm morphology, numbers, and motility. *Mol Reprod Dev* 2005;72:135-44.
 32. Pryor JL, Krieg RJ Jr, Evans WS, Batson J, Turner TT. Luteinizing hormone secretion by male rat pituitary cells perfused in vitro: effect of experimental left varicocele and orchiectomy. *J Androl* 1989;10:372-7.
 33. Buretić-Tomljanović A, Vlastelić I, Radojčić Badovinac A, Starčević Čizmarević N, Nadalin S, Ristić S. The impact of hemochromatosis mutations and transferrin genotype on gonadotrophin serum levels in infertile men. *Fertil Steril* doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.02.129.
 34. Larsson PK, Cleasson HE, Kennedy BP. Multiple splice variants of the human calcium-independent phospholipase A2 and their effect on enzyme activity. *J Biol Chem* 1998; 273:207-14.
 35. Bao S, Jacobson DA, Wohltmann M, Bohrer A, Jin W, Philipson LH et al. Glucose homeostasis, insulin secretion, and islet phospholipids in mice that overexpress iPLA2 β in pancreatic β -cells and in iPLA2 β -null mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;294:E217-29.
 36. Song K, Zhang X, Zhao Ch, Ang NT, Ma ZA. Inhibition of the Ca²⁺-independent phospholipase A₂ results in insufficient insulin secretion and glucose tolerance. *Mol Endocrinol* 2005;19:504-15.
 37. Barbosa NR, Junqueira M, Vallada HP, Gattaz WF. Association between BDNF genotype and increased phospholipase A2 activity in schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2007;257:340-3.
 38. Reddy RD, Yao JK. Environmental factors and membrane polyunsaturated fatty acids in schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003;69:385-91.
 39. Hibbeln JR, Makino KK, Martin CE, Dickerson F, Boronow J, Fenton WS. Smoking, gender, and dietary influences on erythrocyte essential fatty acid composition among patients with schizophrenia or schizoaffective disorder. *Biol Psychiatry* 2003;53:431-441.
 40. Rao JS, Ertley RN, DeMar Jr. JC, Rapoport SI, Bazinet RP, Lee HJ. Dietary n-3 PUFA deprivation alters expression of enzymes of the arachidonic and docosahexaenoic acid cascades in rat frontal cortex. *Mol Psychiatry* 2007;12:151-7.
 41. Marin P, Hamon B, Glowinski J, Premont J. Nicotine-induced inhibition of neuronal phospholipase A2. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;280:1277-83.